

Multiple pathways control spindle asymmetry through asymmetric recruitment of Kar9

Doctoral Thesis**Author(s):**

Leisner, Christian

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005724356>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 17831

Multiple pathways control spindle asymmetry through asymmetric recruitment of Kar9

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Dr. sc. ETH Zurich

presented by

Christian V. V. Leisner

Master of Science
Roskilde Universitet, Denmark

born May 11th 1975
Frederikshavn, Denmark

accepted on the recommendation of

Prof. Yves Barral, examiner
Prof. Matthias Peter, co-examiner
Prof. Viesturs Simanis, co-examiner

2008

Abstract

The mitotic spindle aligns along an intracellular polarity axis and directs the site of cell cleavage during asymmetric cell division in a variety of cell types. During asymmetric division in *S. cerevisiae*, the cleavage plane is predetermined and the spindle must align along the mother-bud axis and position at the bud neck for proper segregation of the two nuclei. Proper spindle alignment and positioning is achieved when the protein Kar9 is loaded onto the bud-proximal spindle aster only, thus pulling only one spindle pole toward the bud. Kar9 asymmetry is partially controlled through its phosphorylation by the cyclin dependent kinase Cdc28 in complex with B-type cyclins. Since non-phosphorylatable Kar9-AA localizes more to both spindle asters, phosphorylation of Kar9 by Cdc28 seems to prevent interaction of WT Kar9 with the bud-distal aster. Interestingly, Cdc28 also only accumulates on the proximal aster and this localization depends on Kar9. Hence, it is unclear where Cdc28 phosphorylates Kar9 and how phosphorylation makes Kar9 asymmetric. Furthermore, knocking out Cdc28-dependent Kar9 asymmetry does not make Kar9 fully symmetric, suggesting that additional Cdc28-independent mechanisms must control Kar9 asymmetry. However, no such mechanisms are known.

To study how Cdc28 controls Kar9 asymmetry we created a library of *kar9* alleles for which the expressed mutants were deficient in interaction with Cdc28. By examining the phosphorylation level and localization of these Kar9 mutants as well as Cdc28 localization, we learned that two distinct interactions exist between Kar9 and Cdc28. One interaction exists where Kar9 tethers Cdc28 to astral microtubules (aMTs), and one where Cdc28 phosphorylates Kar9. Studying aMT length as a read-out for local Cdc28 activity showed that Cdc28 activity was high on the distal pole and low on the proximal pole. In addition, by forcing increased Cdc28 association with aMTs, we saw that Cdc28 activity was reduced. Together, these data suggest that cytoplasmic Cdc28 phosphorylates Kar9 on the distal pole, which prevents accumulation of Kar9 and Cdc28 on aMTs. Concurrently, lack of Kar9 phosphorylation on the proximal pole due to reduced Cdc28 activity allows accumulation on aMTs.

Looking for additional mechanisms that affect Kar9 localization, we found that SUMO regulates Kar9 asymmetry. This regulation takes place in two independent ways. On one hand, Kar9 was directly sumoylated *in vivo*, and Kar9 sumoylation promoted its asymmetric distribution independently of Kar9 phosphorylation by Cdc28. On the other hand, proper regulation of kinetochores by SUMO was also required for Kar9 asymmetry. Indeed, activation of the spindle assembly checkpoint (SAC) following SUMO and kinetochore defects promoted symmetric redistribution of Kar9 in a *MAD2*-dependent manner. The control of Kar9 asymmetry by the SAC was independent of Kar9 sumoylation and phosphorylation.

Through a Kar9 localization screen, we also identified a number of proteins involved in Kar9 asymmetry including mitotic exit component Tem1. Tem1 has previously been shown to

act during anaphase. Here, we show that Tem1 also acts during metaphase to promote Kar9 asymmetry, possibly through one of the known pathways.

Our data reveal that at least two independent mechanisms create Kar9 asymmetry. In addition, activation of the SAC negatively regulates Kar9 asymmetry. Together, these findings show the complexity in creating and maintaining spindle asymmetry.

Zusammenfassung

In vielen Zelltypen positioniert sich die mitotische Spindel während der asymmetrischen Zellteilung entlang einer intrazellulären Polaritätsachse und bestimmt so die Position der Furchungsteilung. Da die Spaltebene in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bereits durch den Knospenhals vorbestimmt ist, muss die Spindel hier aktiv entlang der Längsachse der sich teilenden Zelle orientiert werden. Nur auf diese Weise ist eine korrekte Segregation der beiden Nuklei zwischen Mutter- und Tochterzelle gewährleistet. Die Spindel wird aktiv am der Tochterzelle näheren (proximalen) Spindelpol gezogen und so entlang der Polaritätsachse ausgerichtet. Das Protein Kar9 lokalisiert vornehmlich am proximalen Pol und den astralen Mikrotubuli und trägt massgeblich zum aktiven Zugmechanismus bei. Diese Asymmetrie wird unter anderem durch die Phosphorylierung von Kar9 durch einen Komplex aus der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 und einem B-Typ Cyclin kontrolliert. Mutierte Versionen von Kar9, die nicht phosphoryliert werden können, können auf beiden Seiten der Spindel nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von Kar9 durch Cdc28 in Wildtyp-Zellen könnte die Akkumulation von Kar9 auf der distalen Seite der Spindel verhindern. Interessanterweise lokalisiert auch Cdc28 vornehmlich am proximalen Teil der Spindel in Kar9-abhängiger Art und Weise. Es ist nicht bekannt, wo in der Zelle Kar9 durch Cdc28 phosphoryliert wird und, wie diese Phosphorylierung die asymmetrische Lokalisierung von Kar9 reguliert. Ausserdem scheinen zusätzlich Cdc28-unabhängige Mechanismen zu existieren, die die Verteilung von Kar9 regulieren, da keine der Phosphorylierungs-Mutanten zu vollständiger Kar9-Symmetrie entlang der Mitosespindel führt.

Um der Frage nachzugehen, wie Cdc28 die Asymmetrie von Kar9 kontrolliert, isolierten wir eine Reihe von *kar9*-Allelen, die nur mangelhaft mit Cdc28 interagieren. Durch Untersuchung der Phosphorylierung und Lokalisation dieser mutierten Kar9-Proteine sowie der Lokalisation von Cdc28 in diesen Zellen, konnten wir zwei unterschiedliche Interaktionen zwischen Kar9 und Cdc28 nachweisen. Einerseits bindet Cdc28 an die astralen Mikrotubuli (aMTs). Andererseits erkennt es Kar9 und phosphoryliert es, nachdem es das Protein gebunden hat. Eine Analyse der aMT-Länge, die als Indikator für Aktivität von Cdc28 diene, lieferte Hinweise auf eine erhöhte Aktivität dieser Kinase auf der distalen im Vergleich zur proximalen Seite der mitotischen Spindel. Ausserdem stellten wir fest, dass eine verstärkte Interaktion zwischen Cdc28 und aMTs die Aktivität von Cdc28 senkte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zytoplasmatisches Cdc28 Kar9 am distalen Spindelpol phosphoryliert und damit verhindert, dass Cdc28 und Kar9 sich auf aMTs anreichern. Gleichzeitig führt die verminderte Aktivität von Cdc28 am proximalen Pol zu reduzierter Phosphorylierung von Kar9 und somit zu dessen Akkumulation auf den aMTs.

Auf der Suche nach weiteren Mechanismen zur Kontrolle der Kar9-Lokalisierung konnten wir zeigen, dass Sumoylierung die Asymmetrie von Kar9 reguliert. Dies geschieht durch zwei

unabhängige Mechanismen: Erstens wird Kar9 *in vivo* sumoyliert. Diese Modifikation reguliert die Asymmetrie von Kar9 unabhängig von dessen Phosphorylierung durch Cdc28. Zweitens scheint die Kontrolle der Kinetochoren durch Sumoylierung für die Aufrechterhaltung der Kar9 Asymmetrie erforderlich zu sein. Die Aktivierung des Spindle Assembly Checkpoints (SAC) durch Mutationen in SUMO oder Kinetochoren führte zu symmetrischer Lokalisation von Kar9 in Mad2-abhängiger Weise. Die Kontrolle der Kar9 Asymmetrie durch den SAC erfolgte unabhängig von dessen Sumoylierung und Phosphorylierung.

Mittels eines Screens basierend auf der Lokalisierung von Kar9 konnten wir zusätzlich eine Reihe von weiteren Proteinen identifizieren, die ebenfalls an der Regulierung der Kar9-Asymmetrie beteiligt sind: Das Mitotic Exit Network-Protein Tem1 zum Beispiel spielt während der Metaphase eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Kar9-Asymmetrie. Tem1 war bislang ausschliesslich für seine Funktion während der Anaphase bekannt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mindestens zwei unabhängige Mechanismen zur Regulierung der Asymmetrie von Kar9 existieren müssen. Ausserdem führt die Aktivierung des SAC zu symmetrischer Lokalisierung von Kar9. Die Ergebnisse dieser Arbeit illustrieren die enorme Komplexität, die hinter der Entstehung und Aufrechterhaltung der Spindelasymmetrie steht.